

心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性 蛋白リン酸化酵素に関する研究

I. イヌ心筋 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate 依存性 蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

東京都養育院付属病院内科

坂 井 誠

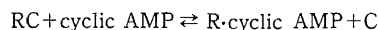
(昭和60年3月29日受付)

動物組織に広く存在する cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) 依存性蛋白リン酸化酵素のイヌ心筋における酵素学的性質を検討した。イヌ心筋のホモジェネートを $29,000\times g$ で20分遠心し、その上清を硫酸分画して酵素標品とした。蛋白リン酸化酵素活性の至適 pH は6~7で、活性には二価の金属イオンを必要とし、マグネシウムが最も有効であった。その k_m 値は0.7 mM で、cyclic AMP 添加の有無で差を認めなかった。ヒストンのリン酸化に対する cyclic AMP のみかけの k_m 値は30 nM で $5\times 10^{-8}M$ で3倍の酵素活性の上昇がみられたのに対し、cyclic AMP 以外の他のヌクレオシドでは $5\times 10^{-6}M$ で cyclic AMP に近い活性を示した。基質であるヒストン、アデノシン三リン酸の k_m 値はそれぞれ100 $\mu g/ml$, 20 μM で、cyclic AMP の添加の有無で差を認めなかった。ヒストン以外の基質としてプロタミンを使用した場合には cyclic AMP 依存性活性はヒストンの1/4であった。DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで蛋白リン酸化酵素は溶出塩濃度の違いによりタイプIとタイプIIのアイソザイムに分離することが知られているが、イヌ心筋蛋白リン酸化酵素は0.1~0.2 M の高い塩濃度で溶出し、タイプIIであることが明らかとなった。以上よりイヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素の性質は他の動物心のそれと類似し、そのアイソザイムの型はヒト、ウシなどの大動物心と一致した。

Key words 心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素, 基質, Michaelis 定数 (K_m), 蛋白リン酸化酵素アイソザイム。

Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) 依存性蛋白リン酸化酵素は種々の蛋白をリン酸化する酵素で、cyclic AMP によって著明に活性が上昇する。リン酸化をうけるのは蛋白質のセリンまたはスレオニン残基といわれている。本酵素は生理的濃度の cyclic AMP によって賦活され、広く動物組織に存在することから cyclic AMP によるホルモン効果は大部分本酵素の活性化を通じて発現することが示唆されてきた¹⁾。そしてその活性化反応は次式の如く、蛋白リン酸化酵素のホロ酵素の subunit の一方の regula-

tory subunit (R) に cyclic AMP が結合すると, catalytic subunit (C) が遊離するためにおこることが確認されている²⁾³⁾。



心筋組織においても本酵素は cyclic AMP の標的酵素として、種々の動物心に存在することは証明されている^{3)~5)}。イヌ心筋の本酵素についての知見は乏しい。そこで著者はイヌを用いた cyclic AMP を介するホルモンのモデル実験の基礎的検討としてイヌ心筋における本酵素の酵素学的性質を検討した。

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; C, catalytic subunit of protein kinase; cyclic AMP, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate; cyclic CMP, cyclic cytidine 3', 5'-monophosphate; cyclic GMP, cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate; cyclic IMP, cyclic

また蛋白リン酸化酵素にはアイソザイムが存在し、DEAEセルローズカラムクロマトグラフィーで溶出塩濃度の違いによりタイプIとIIのアイソザイムに分離され、種々の性質が異なることが判明している⁶⁾。そこでイヌ心筋の本酵素のアイソザイムパターンについても検討を加えた。

材料および方法

1. イヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素の調製

雑種成犬をペントバルビタール麻酔で開胸後、直ちに心臓を摘出し、心房、小血管を除いた心室筋を重量1g当たり5倍の5mMリン酸カリウム、2mM EDTA (pH 7.0) で、4°C下2分間ワーリングブレンダーを用いて粉砕した。29,000×gで20分間遠心して得た上清に15mg/dlの硫酸プロタミンを添加し、10分間攪拌後遠心した。次にその上清に32g/dlの硫酸アンモニウムを加え、30分攪拌後遠心した。沈渣を100倍量の5mMリン酸カリウム、2mM EDTA (pH 7.0) に溶解し、一晚透析を行い、その透析液を酵素標品とした。一部の試験では、この粗酵素標品をさらに5mMリン酸カリウム、2mM EDTA (pH 7.0) で平衡させた2.6×40cmのDEAEセルローズカラムで、0~0.3M塩化ナトリウム直線勾配緩衝液にて溶出し、アイソザイムを分離した。

2. cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性の測定

cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性の測定はKuoら⁷⁾の方法により行った。標準の反応溶液は50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)、5mM酢酸マグネシウム、5mMフッ化ナトリウム、0.1mM EGTA、0.1mM γ -³²P-ATP (20,000 cpm/nmol)、2mM テオフィリン、2mg/ml 子牛胸線ヒストン、2.5 μ M cyclic AMP の存在または非存在下に酵素標品を加えて総量200 μ lとした。30°Cで30分間反応させた後、4mlの5%トリクロール酢酸(TCA)、0.25%タングステン酸ナトリウム(Na₂WO₄)液(pH 2.0)を加えて反応をとめた。3000 rpm、10分間で遠心した沈渣を1N水酸化ナトリウム(NaOH) 0.1mlで溶解し、再びTCA、Na₂WO₄液を加え、1.2N硫酸0.1mlを加えた、3000 rpmで10分間遠心し、この操作をもう一度くりかえしたあと、沈渣を1N NaOH 50 μ lで溶解し、10mlのシンチレーター溶液(7%トルエン、30%トリトンX-

100の混液1l中に4gのPPO、0.1gのPOPOPを含む)を加え、液体シンチレーションカウンター(Packard, Model 3385)にて測定した。活性は pmoles Pi incorporated/ μ g protein or tube/min で示した。なお反応溶液中に2.5 μ M ないし 5 μ M cyclic AMP を加えた時の活性を総活性とし、cyclic AMP を加えない時の活性との差を cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素活性と表現した。蛋白量はLowry法⁸⁾により測定した。

cyclic AMP 結合能はGilman⁹⁾の方法により測定した。

γ -³²P-ATP は Amersham Searle 社、子牛胸線ヒストンは Sigma 社、DEAEセルローズは Whatman 社から得た。

成 績

1. 酵素活性測定条件の検討

1) 酵 素 量

酵素量を変えて蛋白リン酸化酵素活性を測定すると(図1)、cyclic AMP 添加による蛋白リン酸化酵素総活性は30 μ gまで、cyclic AMP 非添加時の活性は60 μ gまで活性は直線的に上昇した。従って以下の実験では蛋白リン酸化酵素活性の測定に10~30 μ gの蛋白量を用いた。

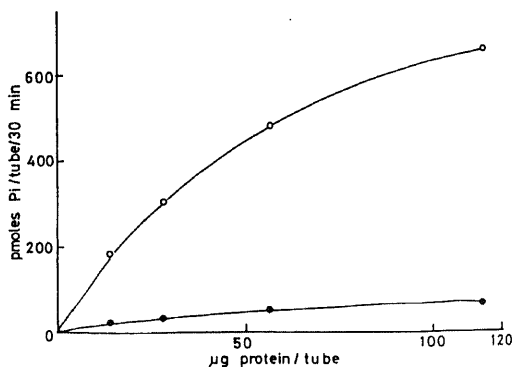


Fig. 1. The effect of enzyme concentration on protein kinase activity.

Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of 2.5 μ M cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in enzyme concentration.

inosine 3', 5'-monophosphate; cyclic UMP, cyclic uridine 3', 5'-monophosphate; dibutyryl cyclic AMP, N⁶-2', 0-dibutyryl adenosine 3', 5'-monophosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol bis (β -aminoethyl ether)-N, N'-tetraacetic acid;

2) 反応時間

蛋白リン酸化酵素活性を時間を追って調べた成績を図2に示す。cyclic AMP を加えない場合も、加えた場合もヒストンのリン酸化は50分まではほぼ直線的に増加することが示された。従って、以後の実験では反応時間は15分または30分に設定した。

3) 至適 pH

蛋白リン酸化酵素活性に対する pH の影響を調べた成績を図3に示す。リン酸緩衝液に比べ酢酸緩衝液の方が高い酵素活性を示した。両緩衝液とも cyclic

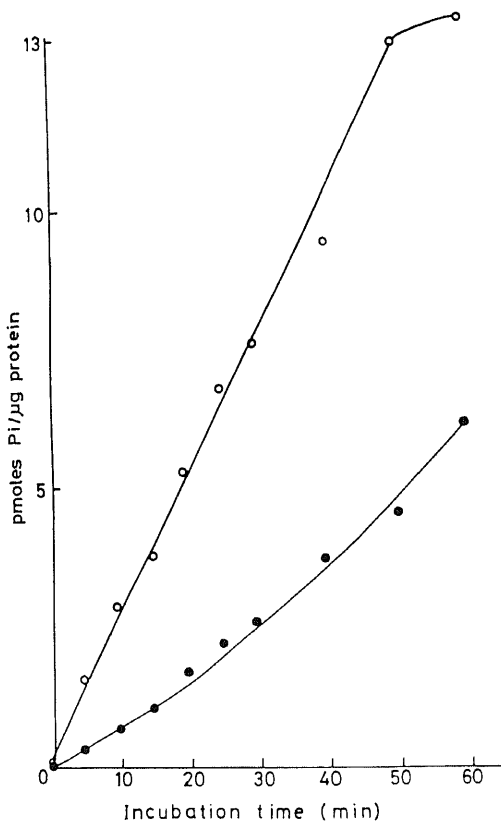


Fig. 2. The effect of incubation time on protein kinase activity.

Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in incubation time. The amount of enzyme used was $20 \mu\text{g}$.

AMP の存在下で酵素活性は約3倍上昇した。至適 pH は6~7であった。

2. 基質および effector の濃度と酵素活性

1) ヒストン

基質であるヒストンの濃度をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図4に示す。ヒストン濃度が 0.4 mg/ml までは蛋白リン酸化酵素総活性, cyclic AMP 非添加時活性はともに上昇したが、それ以上の濃度では総活性は減少した。half maximal phosphorylation から計算した k_m 値は $100 \mu\text{g/ml}$ で、cyclic AMP の有無で差を認めなかった。また V_{max} は cyclic AMP 添加時 $11.4 \text{ pmoles Pi}/\mu\text{g protein}/30 \text{ 分}$ 、非添加時 $2.1 \text{ pmoles Pi}/\mu\text{g protein}/30 \text{ 分}$ であり、cyclic AMP 添加により酵素と基質の親和性は変化せ

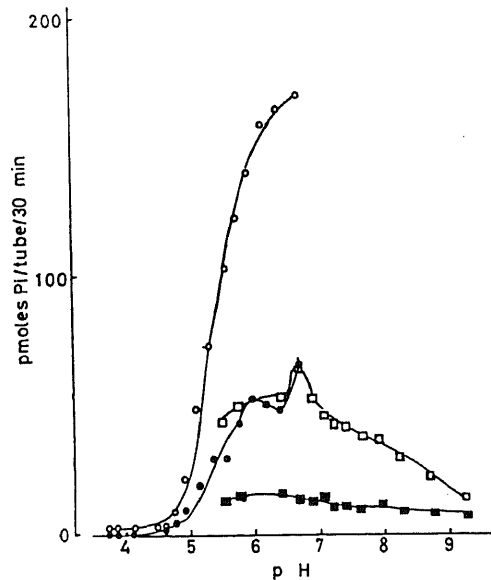


Fig. 3. The effect of pH on protein kinase activity. Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of $5 \mu\text{M}$ cyclic AMP using 50 mM sodium acetate in incubation mixture and in the absence (■—■) or presence (□—□) of $5 \mu\text{M}$ cyclic AMP using 50 mM potassium phosphate in incubation mixture. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in pH of 50 mM sodium acetate and potassium phosphate. The amount of enzyme used was $15 \mu\text{g}$.

K_m , Michaelis's constant; POPOP, 1, 4-bis [2- (4-methyl-5-phenyloxazolyl)] benzene; PPO, 2, 5-diphenyloxazole; R, regulatory subunit of protein kinase; RC, holoenzyme of protein kinase; V_{max} , maximal velocity of enzyme reaction.

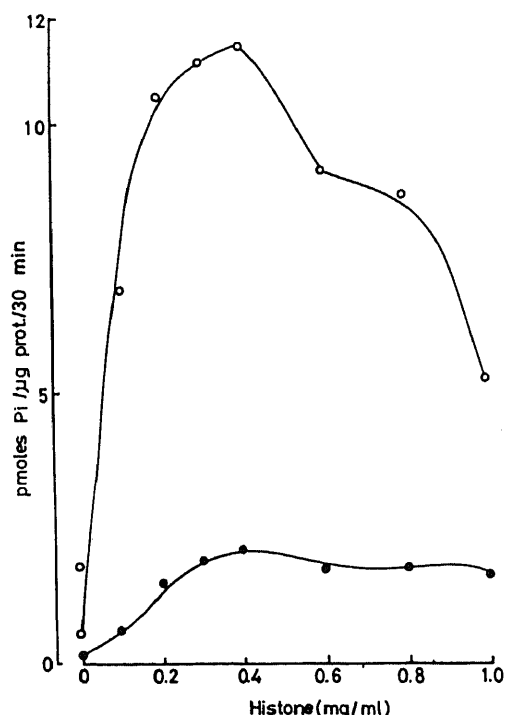
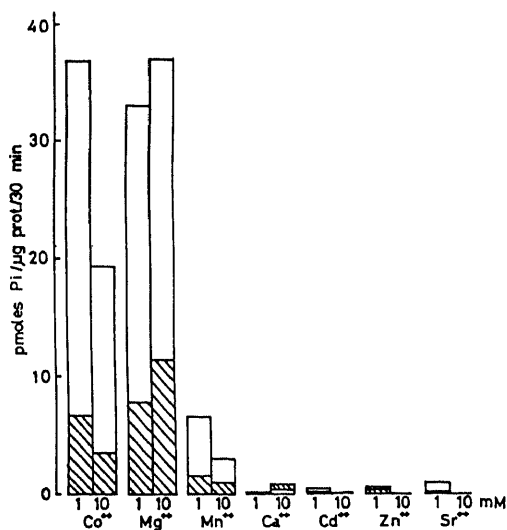


Fig. 4. The effect of histone concentration on protein kinase activity.

Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of cyclic AMP as indicated. The amount of enzyme used was $20 \mu\text{g}$.



ず、約5倍の V_{max} の増大がみられた。

2) アデノシン三リン酸 (ATP)

図5は、ATPの濃度をかえて (hot ATPは一定で cold ATPをかえて調整) 蛋白リン酸化酵素活性を調べた成績で、ATPの濃度を高めることにより、蛋白リン酸化酵素の総活性、cyclic AMP非添加時活性とも

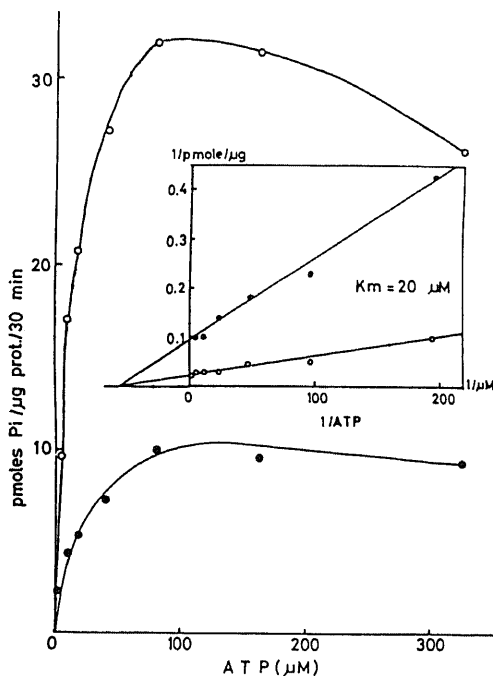


Fig. 5. The effect of ATP concentration on protein kinase activity.

Various ATP concentrations were prepared by the addition of cold ATP. Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of ATP as indicated. K_m value for ATP was calculated by double reciprocal plot as shown in the inset. The amount of enzyme used was $18 \mu\text{g}$.

Fig. 6. The effect of various divalent cations on protein kinase activity.

Protein kinase activity was measured in the absence (crosshatched bars) or presence (plain bars) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for 1 and 10 mM concentration of various divalent cations as indicated. The amount of enzyme used was $15 \mu\text{g}$.

に増加を示し、約 $100 \mu\text{M}$ でプラトーに達した。double reciprocal plot によるとその K_m 値は $20 \mu\text{M}$ で、cyclic AMP の有無で差を認めなかった。Vmax は cyclic AMP 添加時 $32 \text{ pmoles Pi}/\mu\text{g protein}/30 \text{ 分}$ 、非添加時 $10 \text{ pmoles Pi}/\mu\text{g protein}/30 \text{ 分}$ と cyclic AMP 添加により約 3 倍の増大がみられた。

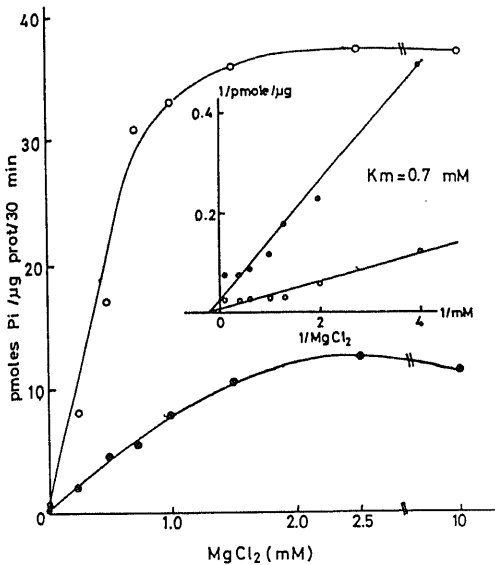
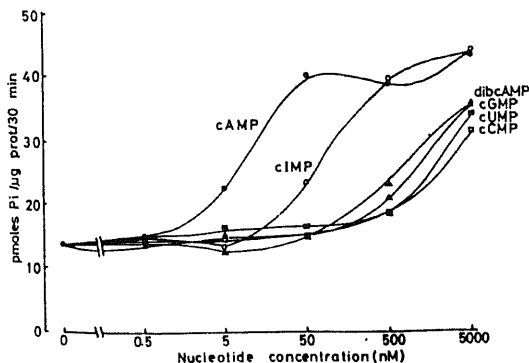


Fig. 7. The effect of magnesium concentration on protein kinase activity. Protein kinase activity was measured in the absence (●—●) or presence (○—○) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of magnesium as indicated. K_m value for magnesium was calculated by double reciprocal plot as shown in the inset. The amount of enzyme used was $22 \mu\text{g}$.



3) マグネシウム

蛋白リン酸化酵素はその活性に二価の陽イオンを必要とする。図 6 に示すように $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ではマグネシウムで活性が最も高く、コバルトでは $1 \times 10^{-3} \text{M}$ で最も有効であった。マグネシウムの濃度をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図 7 に示す。マグネシウムに対する K_m 値は 0.7 mM で、cyclic AMP の有無でほとんど差を認めなかった。

4) cyclic AMP

cyclic AMP の濃度をかえて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図 8 に示す。cyclic AMP による蛋

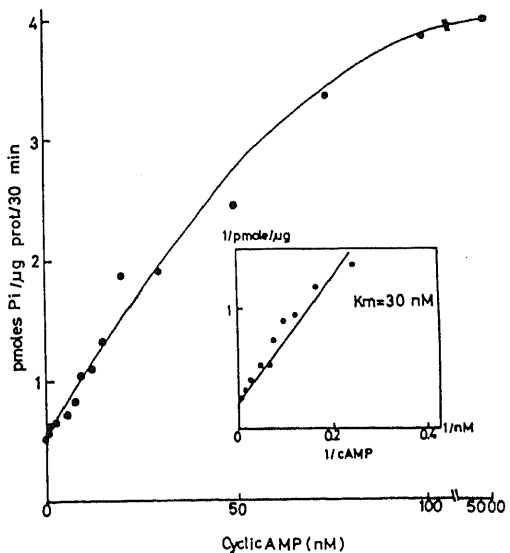
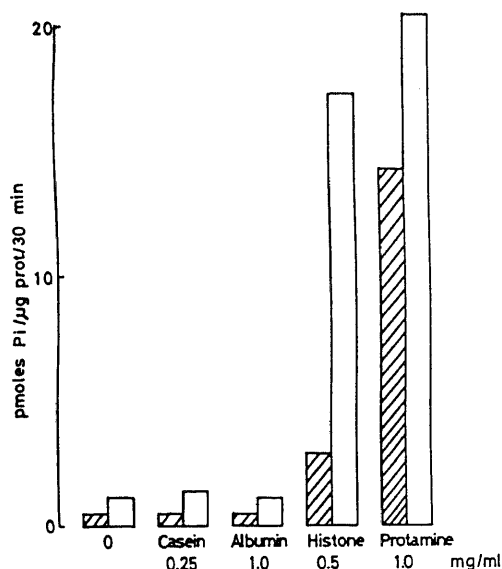


Fig. 8. The effect of cyclic AMP concentration on protein kinase activity. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in amount of cyclic AMP as indicated. K_m value for cyclic AMP was calculated by double reciprocal plot as shown in the inset. The amount of enzyme used was $15 \mu\text{g}$.

Fig. 9. The effect of various cyclic nucleotide concentration on protein kinase activity. Incubation conditions were as described in the text, except for the variation in the amount of various cyclic nucleotides as follows; ●—●, cyclic AMP (cAMP); ○—○, cyclic IMP (cIMP); △—△, dibutyl cyclic AMP (dibcAMP); ▲—▲, cyclic GMP (cGMP); ■—■, cyclic UMP (cUMP); □—□, cyclic CMP (cCMP). The amount of enzyme used was $20 \mu\text{g}$.

白リン酸化酵素活性の上昇は $5 \times 10^{-8} \text{M}$ でみられ、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ で約 8 倍の活性上昇を示した。double reciprocal plot によるとみかけの k_m 値は 30 nM で



あった。

5) cyclic AMP 以外のヌクレオシド

各種ヌクレオシドの蛋白リン酸化酵素活性に与える影響を cyclic AMP の効果と比較した (図 9)。cyclic AMP は $5 \times 10^{-8} \text{M}$ で蛋白リン酸化酵素活性を 3 倍に上昇させ、最大効果を示した。次いで cyclic AMP が有効で, dibutyryl cyclic AMP, cyclic GMP, cyclic UMP, cyclic CMP では酵素活性の賦活に $5 \times 10^{-6} \text{M}$ という高濃度を要し, あまり効果がなかった。

6) 基質特異性

ヒストン以外に基質となるプロタミン, カゼイン, アルブミンを用いて蛋白リン酸化酵素活性を測定した成績を図 10 に示す。ヒストンでは cyclic AMP の添加

Fig. 10. The effect of various substrates on protein kinase activity.

Protein kinase activity was measured in the absence (crosshatched bars) or presence (plain bars) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP. Incubation conditions were as described in the text, except for the concentration of substrates as indicated. The amount of enzyme used was $18 \mu\text{g}$.

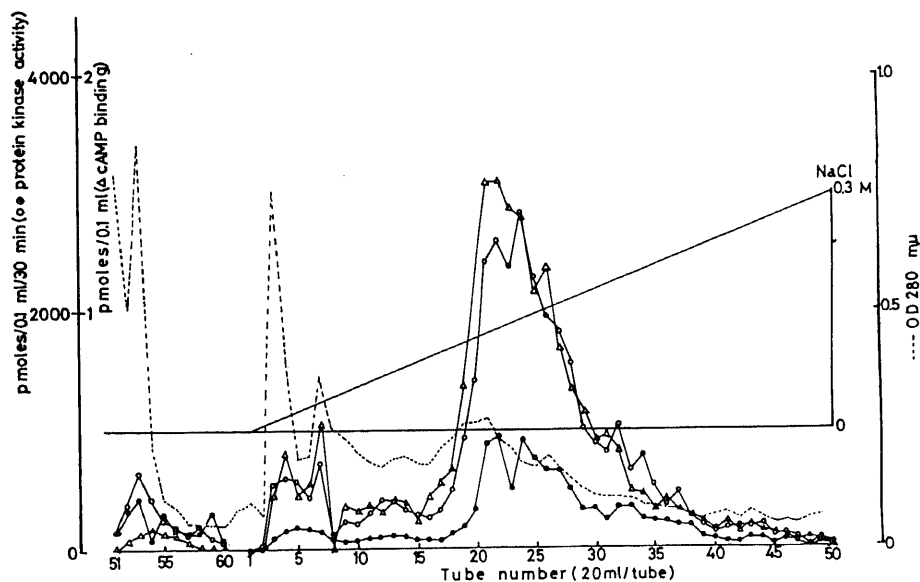


Fig. 11. DEAE-cellulose column chromatography of the dog heart protein kinase.

DEAE-cellulose column ($2.6 \times 40 \text{ cm}$) was previously equilibrated with 5 mM potassium phosphate ($\text{pH } 7.0$) containing 2 mM EDTA and 500 mg of partially purified protein kinase preparations were applied. After washing the column with 200 ml of the same buffer, protein kinase activity was eluted with a linear gradient of 0 to 0.3 M NaCl at a flow rate of 30 ml per hour in 20 ml fractions. After dialysis against the buffer, protein kinase activity of each fraction was assayed in the absence ($\bullet\text{---}\bullet$) or presence ($\circ\text{---}\circ$) of $2.5 \mu\text{M}$ cyclic AMP and cyclic AMP binding ($\triangle\text{---}\triangle$) was measured by the method of Gilman⁹⁾. Protein concentration (\cdots) was monitored by absorbance of optical density at $280 \text{ m}\mu$.

により6倍の活性増加が認められたが、プロタミンでは1.5倍とcyclic AMPによる活性増加に差を認めた。酵素標品のみの対照と比べて、カゼイン、アルブミンを基質として加えてもほとんどリン酸化の増加はなく、カゼイン、アルブミンはリン酸化をうけなかったものと考えられた。

3. 蛋白リン酸化酵素のアイソザイムパターン

酵素標品のアイソザイムパターンを知るために行ったDEAEセルローズカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを図11に示す。イヌ心筋cyclic AMP依存性蛋白リン酸化酵素はほとんど0.1~0.2 Mの高い塩濃度の部分に溶出しており、そのアイソザイムはCorbinら⁶⁾のいうタイプIIであった。蛋白リン酸化酵素はcyclic AMPによって約3倍の活性上昇を示し、そのピークはcyclic AMP結合能と一致した。なおDEAEセルローズカラムクロマトグラフィーで分離したタイプIIアイソザイムの酵素学的性質は粗酵素標品のそれと同一であった。

考 察

cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素は、Walshら¹⁰⁾によりウサギ骨格筋に見出されて以来、cyclic AMPの標的酵素として広く動物組織に存在することが証明されてきた。そして、cyclic AMPの多彩な作用がこの酵素の活性化を通じて行われる反面、この酵素自体には臓器特異性、種特異性が乏しいことが知られている。表1に示す如く、著者らが測定したラットおよびヒトの心筋蛋白リン酸化酵素とイヌ心筋蛋白リン酸化酵素の酵素学的な性質には高い類似性が認められた¹¹⁾¹²⁾。またcyclic AMPに対するみかけの K_m 値は $0.7\sim 3.0\times 10^{-8}M$ でcyclic AMPの平均組織内濃度である $1\times 10^{-6}M$ ¹³⁾に比し1/100低い値であった。

従って細胞内に均等にcyclic AMPが分布するすると、心筋蛋白リン酸化酵素はcyclic AMPにより飽和され、cyclic AMPによる調節がおこりにくいと考えられる。しかし実際にはcyclic AMPと蛋白リン酸化酵素の細胞内の分布は局在しており、cyclic AMPによる調節がなされていると考えられる¹⁴⁾。ATP、マグネシウム、ヒストンに対する K_m 値はcyclic AMPの有無で差を認めなかった。このことはcyclic AMP依存性およびcyclic AMP非添加時の蛋白リン酸化酵素の構造および機能は変わらないことが示唆される。またDEAEセルローズカラムクロマトグラフィーの溶出パターン(図11)にみられるごとく、両活性は同じ位置に溶出している。従ってcyclic AMP非添加時の活性化は $RC \rightarrow R+C$ の解離が反応液中のヒストンにより生ずるためと考えられる。

Kuoら¹⁵⁾はヒストン以外にプロタミン、カゼインなどを基質に用いて種々の臓器から抽出した蛋白リン酸化酵素によるリン酸化を調べた。それによるとRCの解離の程度はヒストン>プロタミン>カゼインの順であり、cyclic AMPによる反応の促進はヒストンでは10倍、プロタミンでは1~4倍であるのに対して、カゼイン基質では認められなかったとしている。本実験でイヌ心筋蛋白リン酸化酵素においても同様の結果が得られた。Kuoら¹⁵⁾はカゼインでも濃度をあげるとcyclic AMP添加によるリン酸の促進がみられたとしているので、イヌ心筋の蛋白リン酸化酵素についても同様のことがおこる可能性はある。また基質によってcyclic AMP添加による活性増加に差があるのは基質自体が $RC \rightarrow R+C$ の解離に作用し、かつその程度が異なるためと思われる。

一方、cyclic AMP依存性蛋白リン酸化酵素にはアイソザイムが存在し、DEAEセルローズカラムクロマ

Table 1. Comparison on enzyme properties of myocardial protein kinase in rat, dog and human

Effector and substrate		Km value		
		Rat ¹¹⁾	Dog	Human ¹²⁾
cAMP		0.7	3.0	$2.0 (\times 10^{-8}M)$
ATP	+cAMP	1.9	2.0	$4.0 (\times 10^{-5}M)$
	-cAMP	1.5	2.0	$4.0 (\times 10^{-5}M)$
Magnesium	+cAMP	0.87	0.7	$2.0 (\times 10^{-3}M)$
	-cAMP	0.82	0.7	$2.0 (\times 10^{-3}M)$
Histone	+cAMP	200	100	110 ($\mu g/ml$)
	-cAMP	300	100	500 ($\mu g/ml$)

Km values for ATP, magnesium and histone were measured in the subsence (-cAMP) or presence (+cAMP) of 2.5 or 5 μM cyclic AMP (cAMP).

トグラフィーで低イオン強度で溶出するタイプIと強いイオン強度で溶出するタイプIIに分離され、種々の性質が異なることが判明している⁶⁾。またアイソザイムの分布は動物種差、組織における差が知られており、動物心においてはマウス、ラットのアイソザイム分布はIが優位で、ネコ、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒトではIIが優位である^{6), 10)}。Corbin ら⁶⁾は心筋蛋白リン酸化酵素アイソザイムのI, IIの性質の差異につき、I, IIは分子量は等しく、ヒストンによる subunit への解離 ($RC \rightarrow R+C$) はIで速く、IIで緩徐であるが、エピネフリンによる蛋白リン酸化酵素の活性化反応はアイソザイムにより差はないと述べている。

また骨格筋において筋収縮速度の速い白筋ではIが多く、筋収縮速度の遅い赤筋ではIIが多いことが知られている^{17), 18)}。この赤筋、白筋の生理的特性と蛋白リン酸化酵素アイソザイムの機能的意義を関連づけてみると興味深い。すなわちIが優位であるラット、マウスなどの小動物では心拍数も多く、心筋収縮速度が速く、ミオシンATPase活性は高く、ミオシンATPaseの特性も白筋的である。大動物になるにつれ、心拍数および心筋収縮速度は遅くなり、ミオシンATPase活性も低くなり、ミオシンATPase特性も赤筋型になる。このように心筋の蛋白リン酸化酵素アイソザイムの生理的機能も赤筋、白筋の機能と何らかに関連したものと推量され、またアイソザイムIが基質により $RC \rightarrow R+C$ が起こりやすいとすれば、cyclic AMP による調節はIの多い白筋ではIIの多い赤筋に比して相対的に弱いことが推定される。

以上のようにイヌ心筋蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質ならびにアイソザイム分布は大動物心、特にヒト心筋と類似し、cyclic AMP を介するホルモンのモデル実験としてイヌを用いることは適切と考えられた。

結 論

イヌ心筋 cyclic AMP 依存性蛋白リン酸化酵素の酵素学的性質を検討した。

1. 蛋白リン酸化酵素活性に対するリン酸カリウムおよび酢酸ナトリウム緩衝液の至適 pH は 6~7 であった。活性には二価の金属イオンを必要とし、 $1 \times 10^{-2}M$ ではマグネシウム、コバルト、マンガンの順に有効であった。マグネシウムに対する km 値は 0.7 mM で、cyclic AMP の添加の有無で差を認めなかった。

2. ヒストンのリン酸化に対する cyclic AMP のみかけの km 値は 30 nM で、 $5 \times 10^{-8}M$ で3倍の酵素活性の上昇がみられたのに対し、cyclic AMP 以外の他のヌクレオシドは $5 \times 10^{-6}M$ で cyclic AMP に近い

活性を示した。

3. 基質であるヒストン、ATP の km 値はそれぞれ 100 $\mu g/ml$, 20 μM で、cyclic AMP の添加の有無で差を認めなかった。ヒストン以外の基質としてプロタミンを使用した場合には cyclic AMP 添加時の活性上昇はヒストンの 1/4 であり、カゼイン、アルブミンではほとんど基質としてのリン酸化を認めなかった。

4. DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーによるアイソザイムの分離においてイヌ心筋蛋白リン酸化酵素は高い塩濃度で溶出し、アイソザイムタイプ II を示した。

謝 辞

稿を終るに臨み、本研究の直接の御指導、御教示を賜りました養育院付属病院松下 哲循環器科長に深く謝意を表します。また御校閲を賜りました竹田亮祐教授、種々の御支援、御教示を賜りました養育院付属病院村上元孝名誉院長、蔵本 策副院長、福井循環器病院三船順一郎副院長に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kuo, J. F. & Greengard, P.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. IV. Wide spread occurrence of cyclic AMP-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **64**, 1349-1355 (1969).
- 2) Brostrom, C. O., Corbin, J. D., King, G. A. & Krebs, E. G.: Interaction of the subunits of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase of muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **68**, 2444-2447 (1971).
- 3) Rubin, C. S., Erlichman, J. & Rosen, O. M.: Molecular forms and subunit composition of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase purified from bovine heart muscle. J. Biol. Chem., **247**, 36-42 (1972).
- 4) Brostrom, M. A., Reiman, E. M., Walsh, D. A. & Krebs, E. G.: A cyclic 3', 5'-AMP stimulated protein kinase from cardiac muscle. Adv. Enzyme Regul., **8**, 191-203 (1970).
- 5) Corbin, J. D., Keely, S. L. & Park, C. R.: The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in adipose, cardiac and other tissues. J. Biol. Chem., **250**, 218-225 (1975).
- 6) Corbin, J. D. & Keely, S. L.: Characterization and regulation of heart adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase isozyme.

- J. Biol. Chem., 252, 910-918 (1977).
- 7) Kuo, J. F., & Greengard, P.: An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 244, 3417-3419 (1969).
- 8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
- 9) Gilman, A. G.: A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 67, 305-312 (1970).
- 10) Walsh, D. A., Perins, J. P. & Krebs, E. G.: An adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem., 243, 3763-3774 (1968).
- 11) Matsushita, S., Sakai, M., Kuramoto, K. & Murakami, M.: Studies on protein kinase of the rat heart (abstract). Jpn. Circ. J., 38, 587 (1974).
- 12) Matsushita, S., Sakai, M., Kaku, T., Nakano, T., Kuramoto, K. & Murakami, M.: An adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase from human heart, p 273-278, In T. Kobayashi, T. Sano & N. S. Dhalla (ed.), Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism, University Park Press, Baltimore, 1978.
- 13) Exton, J. H., Lewis, S. B., Ho, R. J., Robinson, G. A. & Park, C. R.: The role of cyclic AMP in the interaction of glucagon and insulin in the control of liver metabolism. Ann. N. Y. Acad. Sci., 185, 85-100 (1971).
- 14) Corbin, J. D., Sugden, P. H., Loncoln, T. M. & Keely, S. L.: Compartmentalization of adenosine 3', 5'-monophosphate and adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. J. Biol. Chem., 252, 3854-3861 (1977).
- 15) Kuo, J. F., Krueger, B. K., Sanes, J. R. & Greengard, P.: Cyclic nucleotide dependent protein kinase V. Preparation and properties of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase from various bovine tissues. Biochim. Biophys. Acta., 212, 79-91 (1970).
- 16) 松下 哲・品川達夫・賀来 俊・坂井 誠・萬木 信人・蔵本 築・村上元孝: 各種動物心におけるサイクリック AMP 依存性蛋白リン酸化酵素アイソザイムの研究. 代謝異常治療研究基金研究業績集, 6, 40-48 (1979).
- 17) Buchell, A., Cohen, P. T. W. & Cohen, P.: Distribution of isoenzymes of the glycogenolytic cascade in different types of muscle fibre. FEBS Letters, 67, 17-22 (1976).
- 18) Sreter, F. A., Seidel, J. C. & Gergely, J.: Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. J. Biol. Chem., 241, 5772-5780 (1966).

Studies on Myocardial Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase I. Enzyme Properties of Myocardial Cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate Dependent Protein Kinase in Dog Heart Makoto Sakai, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital, Tokyo — J. Jusen Med. Soc., 94, 437-446 (1985).

Key words: myocardial cyclic AMP dependent protein kinase, substrate, Michaelis's constant (Km), protein kinase isozyme.

Abstract

The present study was pursued to examine the enzyme properties of myocardial cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) dependent protein kinase in the dog heart. The protein kinase was assayed on the partially purified preparations (dialyzed ammonium sulfate fractions) of the 29,000×g supernatant of the myocardial homogenate. The optimum pH to the protein kinase activity was between 6 and 7. The divalent cation was required for the protein

kinase activity and magnesium was most effective for the protein kinase activity. The K_m value for magnesium was 0.7 mM with or without cyclic AMP. The protein kinase was activated threefold by 5×10^{-8} M cyclic AMP and the apparent K_m Value for cyclic AMP was 30 nM. Other cyclic nucleotides showed a similar effect at least at 5×10^{-6} M. The K_m Value for adenosine triphosphate was 20 μ M with or without cyclic AMP. Histone was more phosphorylated than protamine. When DEAE cellulose column chromatography was performed with a linear gradient of 0 to 0.3M NaCl, the main peak of the protein kinase was eluted between 0.1 and 0.2M, which is referred to as type II isozyme. These results delineate that the cyclic AMP dependent protein kinase in the dog heart showed similar properties to those of various mammalian tissues.